

细胞进入S期开始下降,到G₂/M期降为零^[8]。Cyclin E/CDK2参与G₁/S期的pRb磷酸化作用,能加速S期,对DNA复制的启动十分重要。Ohtsubo等^[6]发现向G₁期正常的人成纤维细胞微注射抗cyclin E抗体可以抑制细胞进入S期。在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌中,均有cyclin E的过度表达。研究报道^[7,8],cyclin E参与白血病的发生,在急性白血病中cyclin E表达增高,其表达水平与疾病恶性程度有关,高表达者预后差,生存期短。

在本实验中证实,对K562细胞进行甘草次酸干预后,细胞中的两种G₁期调控蛋白cyclin D1和cyclin E表达水平均被下调,细胞周期发生改变,这可能是甘草次酸抑制肿瘤细胞增殖的主要机制。然而此过程中甘草次酸除了下调cyclin D1和cyclin E的表达水平外,是否还牵涉到抑制CDKs的活性或者激活CDI活性^[6],还有待进一步研究。同时,甘草次酸在动物模型体内的作用研究尚在实验摸索中。

参考文献:

- [1] Kim D H, Lee S W, Han M J, *et al.* Biotransformation of glycyrrhizin to 18-beta-glycyrrhetic acid-3-O-beta-D-glucuronide by *Streptococcus* LJ-22, a human intestinal bacterium [J]. *Biol Pharm Bull*, 1999, 22(3): 320-322.
- [2] Rossi T, Castelli M, Zandomenighi G, *et al.* Selectivity of action of glycyrrhizin derivatives on the growth of MCF27 and HEP2 cells [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(5A): 3813.
- [3] Malagoli M, Castelli M, Baggio A, *et al.* Effect of glycyrrhizin and its diastereoisomers on the growth of human tumor cells: pre2 liminary finding [J]. *Phytother Res*, 1998, 12(2): 952-957.
- [4] Peter M, Herskowitz I. Joining the complex: cyclin 2 dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle [J]. *Cell*, 1994, 79(2): 181-184.
- [5] Hirama T, Koeffler H P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer [J]. *Blood*, 1995, 86: 841-854.
- [6] Ohtsubo M, Theodoras A M, Schumacher J, *et al.* Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G₁ to S phase transition [J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(5): 2612-2624.
- [7] Scuderi R, Palucka K A, Pokrovskaja K, *et al.* Cyclin E over expression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B cell lineage [J]. *Blood*, 1996, 87(8): 3360-3367.
- [8] Ito M, Tsurusawa M, Zha Z, *et al.* Cell proliferation in childhood acute leukemia. Comparison of Ki267 and proliferating cell nuclear antigen immunocytochemical and DNA flow cytometric analysis [J]. *Cancer*, 1992, 69(8): 2176-2182.
- [9] Koff A, Cross F, Fisher A, *et al.* Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family [J]. *Cell*, 1991, 66(6): 1217-1228.

大黄素对 LoVo 细胞水通道蛋白2表达的调节效应

张文生¹, 李 锋^{1*}, 鲍军强¹, 王胜春², 尚刚伟³, 李军昌¹, 王长海¹

(1. 第四军医大学西京医院 中医科暨全军中医内科专科中心, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学西京医院 药剂科, 陕西 西安 710032; 3. 第四军医大学唐都医院疼痛生物医学研究所, 陕西 西安 710038)

摘 要:目的 探讨大黄素对外培养 LoVo 细胞水通道蛋白2(aquaporin 2, AQP2)表达的调节效应。方法 体外培养 LoVo 细胞并予不同质量浓度大黄素含药培养液 24 h 处理及大黄素含药培养液 (20 mg/L) 不同时间处理, 采用免疫细胞化学方法观察 LoVo 细胞 AQP2 蛋白表达位置并初步观察 AQP2 蛋白表达的变化趋势, 采用 Western blotting 及半定量 RT-PCR 检测 AQP2 蛋白及 mRNA 的表达。结果 AQP2 表达于 LoVo 细胞的细胞膜, 且与大黄素用药浓度及用药时间存在着相关性。进一步的 Western blotting 证实, 不同质量浓度大黄素含药培养液均可抑制 AQP2 蛋白的表达, 药物质量浓度愈大, AQP2 蛋白的表达愈低, 其中大黄素 20 mg/L 组及 40 mg/L 组 AQP2 蛋白表达显著性降低; 大黄素作用 3、6 h 组, AQP2 蛋白表达上升, 但与对照组比较, 无显著差异; 作用 12、24、48 h 组, AQP2 蛋白表达呈进行性下降趋势。半定量 RT-PCR 结果显示, 随着大黄素质量浓度的增加, AQP2 mRNA 表达呈进行性下降趋势; 在时间-效应方面, 随着用药时间的延长, AQP2 mRNA 表达呈进行性下降趋势。结论 大黄素可抑制 LoVo 细胞 AQP2 基因转录与翻译, 这提示大黄素对 AQP2 表达的调节效应可能与大黄的泻下作用有关。

关键词: 大黄素; LoVo 细胞系; 水通道蛋白2

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)05-0718-06

收稿日期: 2007-09-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572385)

作者简介: 张文生 (1976—), 男, 山西太原人, 主治医师, 硕士, 研究方向为中药防治肾病效应机制与临床评价。

Tel: (029) 82502068 E-mail: zwsqhdpy@fmmu.edu.cn

* 通讯作者 李 锋 Tel: (029) 84775351 E-mail: lifeng@fmmu.edu.cn

Regulative effects of emodin on aquaporin 2 expression in intestinal epithelial cell line LoVoZHANG Wen-sheng¹, LI Feng¹, BAO Jun-qiang¹, WANG Sheng-chun²,SHANG Gang-wei³, LI Jun-chang¹, WANG Chang-hai¹

(1. Department of Traditional Chinese Medicine and Specific Department Center for Traditional Chinese Medicine of PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Pharmaceutics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Institute for Biomedical Sciences of Pain and Functional Brain Disorders, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of emodin in regulating aquaporin 2 (AQP2) in LoVo cells cultured with RPMI-1640 medium containing emodin. **Methods** LoVo cells were cultured with RPMI-1640 medium containing emodin in different concentration for 24 h and were cultured with RPMI-1640 containing emodin (20 mg/L) for different times. The location of AQP2 protein in LoVo cells was defined by immuocytochemistry dyeing and the effects of emodin on regulating aquaporin 2 were initially evaluated. Western blotting and semiquantitative RT-PCR were adopted to detect the relative expression of AQP2 protein and AQP2 mRNA, respectively. **Results** AQP2 was located in plasma membrane of LoVo cell, and moreover, the degree of dyeing correlated with the concentration of emodin and the affecting time. The relative expression of AQP2 protein decreased with the increasing of emodin concentration and that in 20 and 40 mg/L emodin groups decreased significantly; The relative expression of AQP2 protein increased in 3 and 6 h groups. However there was no significant difference contrasted with that in the control group. Then the protein expression gradually decreased in 12, 24, and 48 h groups. The results of semiquantitative RT-PCR demonstrated that the relative expression of AQP2 mRNA decreased with the increasing of emodin concentration. In the time-effect relationship, the relative expression of AQP2 mRNA also decreased with the prolongation of the culture time. **Conclusion** Emodin could inhibit the genetic transcription and the translation of AQP2 gene in LoVo cells, which demonstrates that the change of AQP2 expression regulated by emodin maybe correlate with the cathartic effect of rhubarb.

Key words: emodin; LoVo cell line; aquaporin 2 (AQP2)

大黄是常用的中药之一,具有泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经的作用。《本草经》记载大黄“下瘀血、血闭寒热、破癥瘕积聚、留饮宿食、荡涤肠胃、推陈致新、通利水谷,调中化食,安和五脏”。《本草纲目》谓其主“下痢赤白,里急腹痛,小便淋沥,实热燥结,潮热谵语,黄疸,渚火疮”。大黄也是目前治疗便秘的主要药物之一,在临床上得到广泛应用。大黄素(1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌, emodin)是大黄发挥泻下作用的主要直接活性物质之一,在大黄游离蒽醌中占的比例较大且较稳定^[1]。本研究以人结肠癌 LoVo 细胞为靶细胞,采用免疫细胞组化、Western blotting、RT-PCR 等方法,观察大黄素对体外培养 LoVo 细胞水通道蛋白 2 (aquaporin 2, AQP2) 蛋白及 mRNA 表达的影响,为阐明大黄泻下作用的具体机制提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂:大黄素对照品(化学对照品,定量测定用),购自中国药品生物制品检定所,20 mg/支,批号 110756。RPMI-1640 培养液、小牛血清、胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO),均为 Gibco 公司产

品;AQP2 兔抗多克隆抗体、SABC 试剂盒,β-tubulin 兔抗多克隆抗体、荧光标记二抗,SANTA CRUZ 公司;Trizol 细胞裂解液,Invitrogen 公司;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis 试剂盒, Fermentas 公司;GoTaq Green Master Mix PCR 试剂盒, Promega 公司。

1.2 仪器:倒置相差显微镜,正置显微照相系统,日本 Olympus 公司;CO₂ 恒温细胞培养箱,德国 HERA 公司;梯度 PCR 仪,日本 Biometra 公司;Odyssey 红外荧光成像仪;自动电泳凝胶成像分析仪。

1.3 细胞系:LoVo 细胞株,由第四军医大学动物中心惠赠。

2 方法

2.1 LoVo 细胞的培养:LoVo 细胞系来源于人结肠腺癌,培养呈上皮样生长,于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,37℃、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养,每隔 24 h 更换培养液。细胞长满瓶底约 80% 时,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3~5 min,按 1:3 分瓶传代。

2.2 细胞爬片的制备:取 8 mm×8 mm 的盖玻片,依次用浓硫酸、无水乙醇浸泡,高温高压消毒备用。将消化好的细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释,吹打成浓度为 5×10^4 /mL 的细胞悬液,用吸管吸取细胞悬液,滴加到预置于培养皿中的盖玻片上,待 4~6 h 后,镜下观察细胞已贴壁,加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液或含药培养液。

2.3 药物处理^[2,3]:实验分为大黄素含药培养液不同剂量作用 24 h 及大黄素含药培养液 (20 mg/L) 不同时间作用两大组。其中不同剂量处理分为大黄素高、中、低剂量组 (大黄素质量浓度分别为 40、20、10 mg/L),正常对照组 4 组。不同时间作用处理分为作用时间 48、24、12、6、3 h,正常对照组 6 组。大黄素为 20 mg 加入 DMSO 1 mL,得 20 μ g/ μ L 的大黄素-DMSO 溶液。使用时取 20 μ L 溶液,移入离心管中,加含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 10 mL,无菌滤过即得 40 mg/L 的大黄素含药培养液,依次倍比稀释,可得 20、10 mg/L 的大黄素含药培养液。

在已接种 LoVo 细胞的爬片上,观察细胞已贴壁,即可加入不同质量浓度的大黄素含药培养液,作用 24 h 后,4% 多聚甲醛固定 30 min,用中性树脂贴于载玻片待行 AQP2 免疫细胞化学染色。在已接种 LoVo 细胞的爬片上,观察细胞已贴壁,即可在其中一个培养皿中加入 20 mg/L 的大黄素含药培养液,其他培养皿加入正常含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液;24 h 后,在余下 5 个培养皿中的一个加入 20 mg/L 的大黄素含药培养液,其他 4 个更换正常含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,依次类推。作用结束后,固定爬片并用中性树脂胶贴于载玻片待用。

同细胞爬片的药物处理,在 75 cm² 的培养瓶中接种细胞,给予不同质量浓度大黄素含药培养液作用和大黄素含药培养液 (20 mg/L) 不同时间作用。作用结束后,消化收集细胞进行 Western blotting 检测及 RT-PCR 检测。

2.4 免疫细胞化学染色:按试剂盒说明书进行。取已固定的药物处理过的细胞爬片,用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 漂洗细胞 5 min×2 次;滴加 100× Triton,37℃ 保湿孵育 10 min,PBS 漂洗 5 min×2 次;滴加 1% H₂O₂,37℃ 保湿孵育 10 min,PBS 漂洗 5 min×2 次;分别加入含 1.5% BSA 的 PBS 溶液,按 1:50 稀释的兔抗 AQP2 抗体,4℃ 过夜,次

日复温 1 h,PBS 冲洗 5 min×3 次;加入生物素化抗兔 IgG 抗体,37℃ 保湿孵育 30 min,PBS 冲洗 5 min×3 次;滴加稀释好的 SABC 复合液,37℃ 保湿孵育 30 min,PBS 冲洗 5 min×3 次;用 DAB 显色液反应 10 min,自来水冲洗 2 min;常规核衬染、脱水、脱脂、封片。用 Olympus 显微照相系统摄取相片。

2.5 Western blotting 检测:用 2.5 g/L 胰蛋白酶收集细胞,PBS 冲洗,转到 1.5 mL 离心管中,加细胞裂解液 (含 0.1 mmol/L PBS;1% Nonidet P-40;质量分数 0.05% 去氧胆酸钠;质量分数 0.1% 十二烷基磺酸钠;100 mg/L 苯甲基磺酰氨;1 mg/L 亮氨酸) 1 mL,充分震荡,裂解 5 min;冰上放置 15~30 min;4℃,12 000 r/min,离心 15 min;上清液转移入一新离心管中。利用去污剂蛋白定量试剂盒进行总蛋白定量。采用 SDS-PAGE 凝胶不连续缓冲系统进行电泳。取蛋白样品各 20 μ g,经上样缓冲液处理后上样,其中浓缩胶 3%,80 V,约 30 min;分离胶 10%,120 V,约 90 min。硝酸纤维素膜 100 V 电转膜 120 min。转膜后丽春红染色 2~3 min 观察转膜效果。将转好的膜放入含有 0.5% 聚山梨酯 20 的 PBST 中,洗膜 5 min;然后封入含有 5% BSA 的塑料袋中,室温缓慢摇动 60 min;用 5% BSA 的 PBST 溶液稀释一抗,其中 AQP2 1:200, β -tubulin 1:500;将膜封入塑料袋中,加入一抗稀释液,4℃ 过夜;PBST 洗膜 5 min×2 次,10 min×1 次;加入 PBST 稀释好的荧光标记二抗液 (1:2 000),37℃ 缓慢摇动 60 min;Odyssey 红外荧光成像仪中观察结果并摄影。

2.6 总 RNA 的提取及 RT-PCR 检测

2.6.1 总 RNA 的提取:将收集细胞转入 1.5 mL 离心管中,离心弃去多余 PBS 液,每管加入 Trizol 裂解液 1 mL,吸管吹打至无细胞团块,室温下放置 5 min;加三氯甲烷 200 μ L,混匀,室温放置 10 min;4℃,12 000 r/min,离心 10 min;转上层水相至另一 1.5 mL 离心管中,加三氯甲烷 600 μ L,混匀,室温放置 10 min;4℃,12 000 r/min,离心 10 min,转上层水相至另一 1.5 mL 离心管中,加预冷的异丙醇 600 μ L,混匀,-20℃ 放置 2 h;4℃,12 000 r/min,离心 10 min,弃上清,加预冷的 75% 乙醇-DEPC 水溶液 500 μ L,混匀;4℃,7 500 r/min,离心 10 min,弃上清,37℃、10 min 烘干;溶于 DEPC 处理水中至 20~40 μ L,测定 RNA 浓度及 A_{260}/A_{280} 值,以 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 为合格;-80℃ 低温保存。

2.6.2 RNA 逆转录:取所提取的总 RNA 5 μ g,

oligo (dT)-18 引物 (0.5 $\mu\text{g/L}$) 2 μL , 补加 DEPC 处理水至 12 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min; 加入 M-MuLV 反转录酶 1 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min; 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min; 冰浴 2 min; -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.6.3 PCR 及产物电泳: AQP2 基因序列由美国 ncbi 网站查询获得, 其引物通过美国 Primer 5.0 软件完成设计, 并通过 ncbi blast 核对其特异性, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。其中 AQP2 上游引物: 5'-GGCGTTTGGCTTGGGT-ATT-3'; 下游引物: 5'-CCGGTGTAAATGGATT-CCAAG-3'; 扩增长度: 402 bp; 内参采用 β -actin, 其上游引物: 5'-TGGATTCCCTGTGTCATCCATG-AAAC-3'; 下游引物: 5'-TAAAACGCAGCTCAG-TAACAGTCCG-3'; 扩增长度: 346 bp。采用 25 μL 反应体系, 其中 Go Taq[®] Green Master Mix 2 $\times$ 12.5 μL ; 上游引物 (10 mmol/L) 0.5 μL ; 下游引物 (10 mmol/L) 0.5 μL ; 去离子水 10.5 μL ; 模板 1 μL 。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 60 s, 55 $^{\circ}\text{C}$, 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 60 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终末延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。取 9 μL 产物, 加负载缓冲液 1 μL , 在加入溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳条件为 90 V 恒压, 约 40 min。Marker 为 TaKaRa 公司的 DNA Mark DL 2 000。电泳结束后, 自动电泳凝胶成像分析仪扫描成像。

2.7 统计处理: 药物不同质量浓度及不同作用时间组均重复 3 次。利用 Image-Pro Plus 软件进行 Western blotting 条带平均吸光度值分析, 取目的条带与对应内参 β -tubulin 条带比值, 作为统计数据 ($\bar{x} \pm s$); 利用 Image-Pro Plus 软件进行 RT-PCR 电泳条带的平均灰度值测定, 取目的条带与其对应的内参 β -actin 条带的平均灰度值比值作为统计数据 ($\bar{x} \pm s$)。用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析和 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 免疫细胞化学染色结果: AQP2 蛋白表达在 LoVo 细胞的细胞膜上。免疫细胞化学染色结果提示, LoVo 细胞 AQP2 蛋白的表达与大黄素的用药剂量及用药时间存在着一定的相关性: 随着用药剂量的增加, 染色程度呈下降趋势; 随着用药时间的延长, 染色程度也呈下降趋势。其中大黄素 40 mg/L 组及作用 48 h 组染色最浅。

3.2 Western blotting 检测结果: Western blotting 辅证了免疫细胞化学结果。AQP2 蛋白半定量免疫印迹分析提示 (图 1), 细胞 AQP2 蛋白表达在剂量-

效应及时间-效应方面有相关性。在剂量-效应方面 (图 2), AQP2 蛋白表达随着用药剂量的增加而下降, 其中高、中剂量组与对照组比较存在显著性差异 ($P < 0.05$), 但各剂量组间比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。在时间-效应方面 (图 3), 细胞 AQP2 蛋白表达呈先上升后显著下降趋势, 其中 3、6 h 组

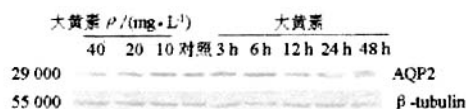
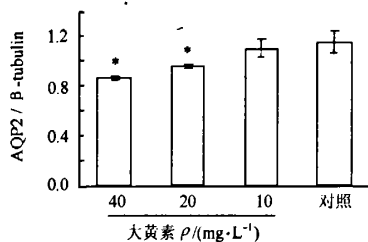


图 1 不同质量浓度大黄素培养液作用 24 h 及大黄素培养液 (20 mg/L) 不同作用时间处理的 LoVo 细胞 AQP2 蛋白 Western blotting 免疫印迹

Fig. 1 Western blotting of AQP2 protein in LoVo cells treated with RPMI-1640 medium containing emodin in different concentration for 24 h and cultured with RPMI-1640 containing emodin (20 mg/L) for different times

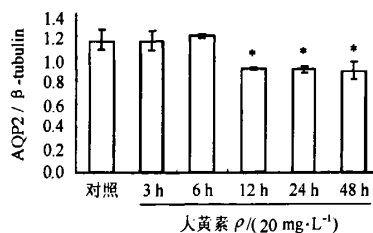


与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

图 2 不同质量浓度大黄素含药培养液处理 24 h 后的 LoVo 细胞 AQP2 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Relative quantity of AQP2 protein expression in LoVo cells treated with RPMI-1640 containing emodin in different concentration for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$

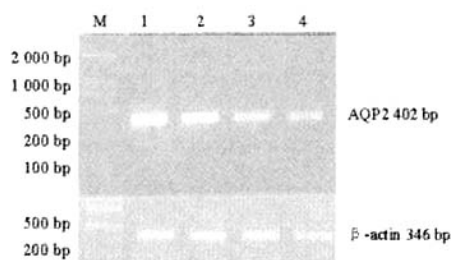
* $P < 0.05$ vs control group

图 3 大黄素含药培养液不同作用时间处理后的 LoVo 细胞 AQP2 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Relative quantity of AQP2 protein expression in LoVo cells treated with RPMI-1640 medium containing emodin for different times ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

AQP2 蛋白表达上升,但无统计学意义 ($P>0.05$); 在作用 12、24、48 h 组各组 AQP2 表达则显著下降 ($P<0.05$),作用 48 h 下降最为明显 ($P<0.01$)。

3.3 RT-PCR 结果:RT-PCR 也从 mRNA 角度证实了 LoVo 细胞存在着 AQP2 mRNA 的表达 (图 4、5)。在剂量-效应方面 (图 6),LoVo 细胞 AQP2 mRNA 表达随着培养液含药浓度的增加而呈下降趋势,与对照组相比,低剂量组 AQP2 mRNA 有下降但无统计学意义,但中、高剂量则呈显著下降 ($P<0.05$);与上一剂量组比较,低剂量组与对照组、中剂量组与高剂量组之间有下降趋势但无统计学意义,但中剂量组与低剂量组比较,则呈显著下降 ($P<0.05$)。在时间-效应方面 (图 7),3 h 组 LoVo 细胞 AQP2 mRNA 相对表达量即显著降低 ($P<0.01$);随着用药时间的延长,AQP2 mRNA 相对表达量持续性降低,各时间组与前一时间组比较,AQP2 mRNA 相对表达量都显著降低 (除 48 h 组与 24 h 组比较 $P<0.05$ 外,其余均为 $P<0.01$)。



M-Marker 1-对照 2~4-大黄素 10、20、40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
M-Marker 1-control 2~4-emodin 10, 20, and 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

图4 不同质量浓度大黄素含药培养液处理的 LoVo 细胞 AQP2 mRNA 表达

Fig. 4 AQP2 mRNA expression in LoVo cells treated with RPMI-1640 medium containing emodin in different concentration

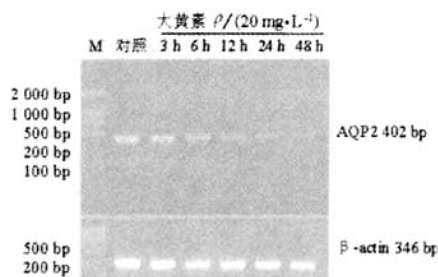
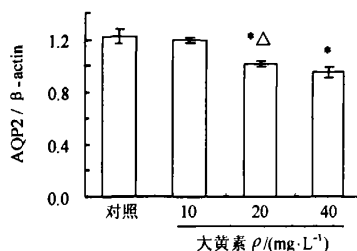


图5 大黄素含药培养液 (20 mg/L) 处理不同时间的 LoVo 细胞 AQP2 mRNA 表达

Fig. 5 AQP2 mRNA expression in LoVo cells treated with RPMI-1640 medium containing emodin (20 mg/L) for different times



与对照组比较: * $P<0.05$;

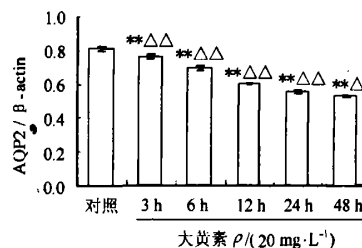
与大黄素 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: $\Delta P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group;

$\Delta P<0.05$ vs emodin 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group

图6 不同质量浓度大黄素含药培养液处理后的 LoVo 细胞 AQP2 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Relative quantity of AQP2 mRNA expression in LoVo cells treated with RPMI-1640 medium containing emodin in different concentration ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: ** $P<0.01$;

与前一时间组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group;

$\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs previous time group

图7 大黄素含药培养液 (20 mg/L) 处理后不同时间 LoVo 细胞 AQP2 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Relative quantity of AQP2 mRNA expression in LoVo cells treated with RPMI-1640 medium containing emodin for different times ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

大黄通过多种机制而发挥泻下效应,其中大黄素具有胆碱样作用,可兴奋肠道平滑肌上的 M 受体,使肠蠕动增加而致泻;抑制细胞膜上的 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性,减少 Na^+ 从肠腔至细胞的转运,使肠内渗透压增加,进而大肠内水分增加、蠕动亢进^[4]。郭世铎等^[5]研究证实,大黄总苷、大黄素能够抑制结肠道对葡萄糖及钠的吸收,水的吸收减少,肠腔容积增大而导致泻下效应。

水通道蛋白 (aquaporins, AQP) 是分布于细胞膜上的,主要负责水分子转运的一类蛋白质家族。目前已经确定至少有 13 种 (AQP0~AQP12) 水通

道蛋白家庭成员,其中 AQP2、AQP3^[6]、AQP4^[7,8]、AQP8 等^[9]AQPs 存在于结肠。AQPs 在肠道上皮细胞大量表达,肠道水液代谢是其主要功能之一。目前认为 AQPs 参与了结肠腔内水分向体内的快速转运,AQPs 使肠内容物水分吸收而形成粪便。Gallardo 等^[10]发现 AQP2 mRNA 表达于大鼠远端结肠隐窝细胞,表面吸收上皮细胞也有少量表达;AQP2 蛋白与 H⁺,K⁺-ATP 酶而不是 Na⁺,K⁺-ATP 酶共表达于表面吸收细胞的顶部。这些结果表明 AQP2 存在于远端结肠并参与了结肠水分的吸收与分泌。

唐宇平等^[11]发现大黄可通过抑制大鼠血脑屏障 AQP4 基因的转录与表达,改善急性脑水肿大鼠血脑屏障损伤。研究发现,中药复方泽黄颗粒能够显著降低糖尿病大鼠肾小管 AQP2 的表达,这可能与泽黄颗粒的肾脏保护作用有关^[12];泽黄颗粒能增加糖尿病大鼠肺微血管内皮 AQP1 的表达,减少肺组织渗出,减轻肺水肿^[13]。以上研究都证明,中药及其复方在发挥药理作用时,参与机体 AQPs 的调节;中药及其复方的某些药理作用可能是通过调节 AQPs 的表达而实现的。

大黄发挥泻下作用机制特点之一就是改变结肠肠腔内外水的分布,而 AQP2 是影响机体内水循环及分布的重要通道分子之一。大黄素泻下效应的主要作用机制能使结肠内水分增加、蠕动亢进。因此推断,大黄对结肠 AQP2 的调节可能是影响结肠肠腔内外水分子转运的重要机制;AQP2 表达减少,可使肠腔内容物水分增加而致泻。

本研究发现,AQP2 主要位于 LoVo 细胞的细胞膜上,并且大黄素可影响 LoVo 细胞 AQP2 mRNA 及蛋白的表达。在剂量-效应方面,大黄素用药剂量增加,AQP2 蛋白表达及 mRNA 表达线性下调呈剂量依赖性。在时间-效应方面,随着大黄素用药时间延长,AQP2 蛋白表达表现为先上升后下降趋势;但其 AQP2 mRNA 表达呈线性下调。这可能是在用药时间较短时(3、6 h),大黄素虽然下调了 AQP2 mRNA 的表达,考虑功能蛋白的合成与降解之间有一时间差,所以形成在大黄素含药培养

液(20 mg/L)培养 3、6 h 组所检测结果 AQP2 蛋白升高而 mRNA 下降的分离现象。随着作用时间的延长,AQP2 蛋白表达随着 mRNA 的下调而表现为下降趋势。

本实验结果表明,大黄素可有效抑制 LoVo 细胞 AQP2 基因转录与翻译。由此推测,在体内大黄素也可能有效下调 AQP2 表达而使结肠对水的吸收减少、结肠肠腔内水分增加;这一机制在大黄泻下效应中可能发挥了重要作用。但大黄素下调 AQP2 蛋白及基因表达的具体机制尚需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 贺福元,罗杰英,阳长明,等. 大黄蒽醌和黄连小檗碱衍生物含量变化及中药成分谱的研究[J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(4): 27-29.
- [2] 周婷,王青,周联,等. 多种中药单体对人结肠癌 HT-29 细胞株 TLR4 mRNA 表达和 IL-8 分泌的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(2): 148-151.
- [3] 李家宁,吕福祯,肖金玲,等. 大黄素抑制肺癌 Anip 973 细胞增殖作用的量效关系[J]. 中国临床康复, 2005, 9(18): 140-141.
- [4] 李娟,李坚. 大黄药理作用研究及临床应用概况[J]. 实用医药杂志, 2006, 9(23): 1132-1134.
- [5] 郭世铎,崔志清,李淑华. 大黄总苷、大黄素、番泻甙对不全梗阻后小鼠离体小肠葡萄糖-钠转运电位的影响[J]. 中药药理与临床, 1994(5): 38-39.
- [6] Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, et al. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon[J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32: 1303-1313.
- [7] Jung J S, Bhat R V, Preston G M, et al. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 13052-13056.
- [8] Wang K S, Ma T, Filiz F, et al. Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279: G463-G470.
- [9] Fischer H, Stenling R, Rubio C, et al. Differential expression of aquaporin 8 in human colonic epithelial cells and colorectal tumors[J]. *BMC Physiol*, 2001(1): 1.
- [10] Gallardo P, Cid L P, Vio C P, et al. Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281: G856-G863.
- [11] 唐宇平,蔡定芳,刘军,等. 大黄改善急性脑出血大鼠血脑屏障损伤的水通道蛋白-4 机理研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(2): 152-156.
- [12] 胡波,李锋,李敏,等. 泽黄煎剂对糖尿病大鼠肾脏水通道蛋白 2 表达的调节[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 179-182.
- [13] 李敏,李锋,胡波,等. 中药泽黄颗粒对糖尿病大鼠肺组织水通道蛋白-1 表达的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(6): 546-549.

大黄素对LoVo细胞水通道蛋白2表达的调节效应

作者：
 [张文生](#),
 [李锋](#),
 [鲍军强](#),
 [王胜春](#),
 [尚刚伟](#),
 [李军昌](#),
 [王长海](#),
 [ZHANG Wen-sheng](#),
 [LI Feng](#),
 [BA Jun-qiang](#),
 [WANG Sheng-chun](#),
 [SHANG Gang-wei](#),
 [LI Jun-chang](#),
 [WANG Chang-hai](#)

作者单位：
 [张文生, 李锋, 鲍军强, 李军昌, 王长海, ZHANG Wen-sheng, LI Feng, BA Jun-qiang, LI Jun-chang, WANG Chang-hai \(第四军医大学西京医院中医科暨全军中医内科专科中心, 陕西, 西安 710032\)](#),
 [王胜春, WANG Sheng-chun \(第四军医大学西京医院药剂科, 陕西, 西安, 710032\)](#),
 [尚刚伟, SHANG Gang-wei \(第四军医大学唐都医院疼痛生物医学研究所, 陕西, 西安710038\)](#)

刊名：
 [中草药](#)

ISTIC

PKU

英文刊名：
 [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)

年, 卷(期):
 2008, 39 (5)

被引用次数:
 6次

参考文献(13条)

- [贺福元; 罗杰英; 阳长明](#) [大黄蒽醌和黄连小檗碱衍生物含量变化及中药成分谱的研究](#)[期刊论文]-[湖南中医学院学报](#) 2000 (04)
- [周婷; 王青; 周联](#) [多种中药单体对人结肠癌HT-29细胞株TLR4 mRNA表达和IL-8分泌的影响](#)[期刊论文]-[广州中医药大学学报](#) 2007 (02)
- [李家宁; 吕福祯; 肖金玲](#) [大黄素抑制肺癌Anip 973细胞增殖作用的量效关系](#)[期刊论文]-[中国临床康复](#) 2005 (18)
- [李娟; 李坚](#) [大黄药理作用研究及1临床应用概况](#)[期刊论文]-[实用医药杂志](#) 2006 (09)
- [郭世铎; 崔志清; 李淑华](#) [大黄总苷、大黄素、番泻甙对不全梗阻后小鼠离体小肠葡萄糖钠转运电位的影响](#) 1994 (05)
- [Silberstein C; Kierbel A; Amdeeo G](#) [Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon](#)[外文期刊] 1999
- [Jung J S; Bhat R V; Preston G M](#) [Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance](#)[外文期刊] 1994
- [Wang K S; Ma T; Filiz F](#) [Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels](#) 2000
- [Fischer H; Stenling R; Rubio C](#) [Differential expression of aquaporin 8 in human colonic epithelial ceils and colorectal tumors](#)[外文期刊] 2001 (01)
- [Gallardo P; Cid L P; Vio C P](#) [Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium](#) 2001
- [唐宇平; 蔡定芳; 刘军](#) [大黄改善急性脑出血大鼠血脑屏障损伤的水通道蛋白-4机理研究](#)[期刊论文]-[中国中西医结合杂志](#) 2006 (02)
- [胡波; 李锋; 李敏](#) [泽黄煎剂对糖尿病大鼠肾脏水通道蛋白2表达的调节](#)[期刊论文]-[中药新药与临床药理](#) 2007 (03)
- [李敏; 李锋; 胡波](#) [中药泽黄颗粒对糖尿病大鼠肺组织水通道蛋白-1表达的影响](#)[期刊论文]-[第四军医大学学报](#) 2007 (06)

本文读者也读过(10条)

- [李文桦; 罗建民; 张英; 张文](#) [α 1, 3 FucT-VII基因转染对人结肠癌LOVO细胞的作用](#)[期刊论文]-[复旦学报 \(医学版\)](#) 2008, 35 (4)

2. [迟德彪](#), [雷林生](#), [金宏](#), [庞建新](#), [蒋毅萍](#) [钩吻素子体外诱导人结肠腺癌LoVo细胞凋亡的实验研究](#)[期刊论文]-[第一军医大学学报](#)2003, 23(9)
3. [清源](#), [江南](#), [罗霞](#), [曾瑾](#), [许晓燕](#), [葛绍荣](#), [QING Yuan](#), [JIANG Nan](#), [LUO Xia](#), [ZENG Jin](#), [XU Xiao-yan](#), [GE Shao-rong](#) [塞卡有效部位提取物对人结肠癌LoVo细胞体外抑制作用的研究](#)[期刊论文]-[时珍国医国药](#)2008, 19(5)
4. [秦建华](#), [陈明](#), [陈廷芳](#), [QIN Jian-hua](#), [CHEN Ming](#), [CHEN Ting-fang](#) [大黄素对IL-1 \$\beta\$ 诱导大鼠肾小管上皮细胞转分化的影响](#)[期刊论文]-[四川医学](#)2008, 29(5)
5. [王青秀](#), [吴纯启](#), [杨红莲](#), [荆淑芳](#), [解跃华](#), [金城](#), [肖小河](#), [廖明阳](#), [WANG Qing-xiu](#), [WU Chun-qi](#), [YANG Hong-lian](#), [JING Shu-fang](#), [XIE Yue-hua](#), [JIN Cheng](#), [XIAO Xiao-he](#), [LIAO Ming-yang](#) [大黄素对HK-2细胞周期增殖的影响](#)[期刊论文]-[毒理学杂志](#)2007, 21(6)
6. [马原](#), [夏勋](#), [顾建文](#), [屈延](#), [匡永勤](#), [程林](#), [张修忠](#) [大黄素对兔颅骨成骨细胞NO/NOS表达的影响](#)[期刊论文]-[四川医学](#)2008, 29(11)
7. [成志锋](#), [张瑛琦](#), [郭敏](#), [乔国芬](#), [CHENG Zhi-feng](#), [ZHANG Ying-qi](#), [GUO Min](#), [QIAO Guo-fen](#) [阿是止泻胶囊对甲状腺功能亢进性腹泻大鼠血浆胃肠激素的影响](#)[期刊论文]-[中国地方病学杂志](#)2008, 27(5)
8. [毕长龙](#), [张瑛琦](#), [翟爱霞](#), [成志锋](#) [阿是止泻胶囊对甲亢性腹泻大鼠十二指肠黏膜肥大细胞的影响](#)[期刊论文]-[哈尔滨医科大学学报](#)2009, 43(2)
9. [吴喜利](#), [孙万森](#), [乔成林](#) [大黄素对大鼠肾小球系膜细胞增殖及IL-6的影响](#)[期刊论文]-[中药材](#)2006, 29(1)
10. [楼恺炯](#), [龚自华](#), [袁耀宗](#), [涂水平](#), [翟祖康](#), [徐家裕](#) [大黄素对急性胰腺炎胰腺组织TGF \$\beta\$ 1表达的影响](#)[期刊论文]-[中国中西医结合杂志](#)2001, 21(6)

引证文献(6条)

1. [叶晓莉](#), [王选深](#), [王彬辉](#), [魏颖慧](#), [冯健](#), [包强](#), [李范珠](#) [pH依赖-时滞型大黄素结肠定位微丸的制备及体外释药研究](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2011(10)
2. [许邑匡](#), [侯伟俊](#) [大黄碳酸氢钠片对血液透析不充分患者的疗效观察](#)[期刊论文]-[中国社区医师（医学专业）](#) 2012(19)
3. [刘青](#), [李锋](#), [李军昌](#), [姚菊峰](#), [王新](#), [王长海](#), [王文](#) [大黄总蒽醌含药血清对LoVo的AQP4表达的调节效应](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2009(24)
4. [马继雄](#) [大黄素药理作用研究进展](#)[期刊论文]-[青海师范大学学报：自然科学版](#) 2011(4)
5. [刘晗](#), [高云](#) [大黄素药理作用的分子机制研究进展](#)[期刊论文]-[中国药理学通报](#) 2009(12)
6. [刘晗](#), [高云](#) [大黄素药理作用的分子机制研究进展](#)[期刊论文]-[中国药理学通报](#) 2009(12)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200805029.aspx